

## МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ И САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ ГЕНА ГЛИЦИНОКСИДАЗЫ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*

Ю.В. Селезнева, Е.А. Николайчик, А.П. Баранец, А.Н. Евтушенков

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

### Введение

В настоящее время гербицид глифосат широко используется во всем мире. Это обусловлено его высокой эффективностью, дешевизной и низкой токсичностью. Кроме того, несмотря на многолетнее широкое использование глифосата в растениеводстве, природная устойчивость к нему встречается достаточно редко.

Глифосат ингибирует 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазу (EPSPS) растений. EPSPS - фермент шикиматного пути, локализованного в хлоропластах, в результате которого происходит биосинтез ароматических аминокислот. Существует несколько подходов к получению растений, устойчивых к глифосату. Первый заключается в амплификации или модификации собственных растительных генов EPSPS; второй состоит в том, чтобы клонировать ген, кодирующий устойчивый к глифосату фермент, из бактерий или грибов и ввести в растения и третий, который стал использоваться относительно недавно, заключается в поиске в природной среде и последующей модификации ферментов, способных расщеплять глифосат до нетоксичных продуктов и введении таких генов в растения [1, 2, 3]. У устойчивых к глифосату растений, которые получены первыми двумя способами, глифосат все равно накапливается в меристемах, что приводит к снижению фертильности и потерям урожая [4, 5]. При использовании третьего подхода остатки глифосата расщепляются до безопасных продуктов, что в конечном итоге благоприятно для растений и приводит к уменьшению загрязнения почвы.

Одним из ферментов способных расщеплять глифосат является глициноксидаза (GO) из бактерий *Bacillus subtilis* [3, 6, 7]. Этот фермент катализирует окислительное дезаминирование глифосата [6, 7]. В данной работе мы клонировали ген GO из трех штаммов *B. subtilis* и модифицировали его так, что фермент стал более активным по отношению к глифосату, чем к глицину.

### Методы исследования

Характеристики использованных в работе штаммов бактерий, плазмид и олигонуклеотидов приведены в таблице.

Культивирование бактерий осуществлялось на полноценной питательной среде при температуре 37°C. Для исследования глициноксидазной активности бактерии засеивали на поверхность селективной среды [11] в чашках Петри. В качестве субстрата для данного фермента использовали саркозин, который глициноксидаза расщепляет эффективнее, чем глицин. Культивировали 12–24 ч при 34°C, а затем выдерживали 3–10 суток при температуре 4°C. Колонии бактерий, обладающих глициноксидазной активностью, окрашивались в темный цвет, в то время как не обладающие такой активностью оставались бесцветными.

Для определения устойчивости к глифосату использовалась минимальная глюкозо-солевая среда с добавлением 0,5 ммоль/л ИПТГ.

Выделение плазмидной ДНК, рестрикцию, лигирование, электрофорез ДНК в агарозном геле проводили по методикам, описанным в руководстве [8]. Для инсерций гена глициноксидазы *thiO* в плазмиды pUC18 и pAlter-1 использованы рестрикционные эндонуклеазы *Eco* RI и *Xba* I. При рестрикционном анализе и молекулярном клонировании использованы ферменты и буферные смеси производства MBI Fermentas.

Выделение тотальной ДНК проводили по методике с использованием N-лаурилсаркозина [9].

Сайт-направленный мутагенез проводили с использованием набора «Altered Sites II» (Promega) в соответствии с рекомендациями производителя. Подвергнутые мутагенезу плазмиды вводили в клетки *E. coli* ES1301 с помощью электропорации, во всех остальных случаях для введения плазмид в клетки использовали кальциевую трансформацию.

Для ПЦР использовали ДНК-полимеразу *Pfu*, дезоксинуклеотидтрифосфаты и олигонуклеотиды производства «Праймтех».

Таблица 1 – штаммы бактерий, плазмиды и олигонуклеотиды

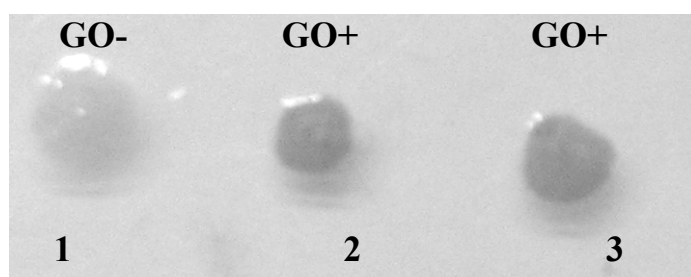
Название	Характеристика	Источник
Штаммы бактерий		
<i>B. subtilis</i> 168	Типовой штамм, прототроф	коллекция каф. молекулярной биологии
<i>B. subtilis</i> 1,5	Природный штамм, выделен в России	- "" -
<i>B. subtilis</i> 4K34	Природный штамм, выделен в Беларуси	- "" -
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk-, mk+), relA1, supE44, λ-, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacIqZΔM15]</i>	Promega
<i>E. coli</i> ES1301 mutS	<i>lacZ53, mutS201::Tn5, thyA36, rha-5, metB1, deoC, IN(rrnD-rrnE)</i>	Promega
Плазмиды		
pAlter-1	<i>oriV<sub>ColE1</sub>, Tet<sup>R</sup>, blaM*, lacZ<sub>α</sub></i>	Promega
pUC18	<i>oriV<sub>ColE1</sub>, Ap<sup>R</sup>, lacZ<sub>α</sub></i>	коллекция каф. молекулярной биологии
pGO1	pUC18 с клонированным геном <i>thiO</i> <i>B. subtilis</i> штамма 1,5	эта работа
pGO2	pUC18 с клонированным геном <i>thiO</i> <i>B. subtilis</i> штамма 4K34	- "" -
pGO3	pUC18 с клонированным геном <i>thiO</i> <i>B. subtilis</i> штамма 168	- "" -
pGO10	pAlter-1 с клонированным геном <i>thiO</i> <i>B. subtilis</i> штамма 1,5	- "" -
pGO20	pAlter-1 с клонированным геном <i>thiO</i> <i>B. subtilis</i> штамма 4K34	- "" -
pGO11	pGO1 с 2 мутациями в гене <i>thiO</i>	- "" -
pGO21	pGO2 с 2 мутациями в гене <i>thiO</i>	- "" -
pGO12	pGO1 с 3 мутациями в гене <i>thiO</i>	- "" -
pGO22	pGO2 с 3 мутациями в гене <i>thiO</i>	- "" -
Олигонуклеотиды		
GOf	gcgtctagaggagataaaaaatggcgaaaaggcattatgaagcagt	Праймтех
GOr	gcggaattcatatctgaaccgcctccttgcg	Праймтех
GO5154	acgttcctcgcttctctatggcgctcagcattccggcagc	Праймтех
GO244	ggtacgatatagcatgcatcatggtaaagcgt	Праймтех

### Результаты и обсуждение

На первом этапе работы были клонированы гены глицинооксидазы из трех штаммов бактерий *Bacillus subtilis*: *B. subtilis* 168, *B. subtilis* 1,5 и *B. subtilis* 4K34. Ген глицинооксидазы амплифицировали посредством ПЦР с *Pfu* ДНК-полимеразой с использованием праймеров

GO<sub>f</sub> и GO<sub>r</sub> (таблица 1), сконструированных на основе последовательности гена глициноксидазы *B. subtilis* штамма 168, доступной в нуклеотидных базах данных. Полученные ПЦР-фрагменты были клонированы в векторе pUC18. По результатам рестрикционного анализа плазмидной ДНК были отобраны рекомбинантные плазмиды, несущие целевые фрагменты ДНК размером около 1,1 т.п.н.: pGO1, pGO2 и pGO3 со вставками хромосомной ДНК штаммов *B. subtilis* 1,5, 4K34 и 168 соответственно. Анализ нуклеотидных последовательностей инсерций в рекомбинантных плазмидах показал, что в них действительно клонирован ген *thiO*, кодирующий FAD-зависимую глициноксидазу из хорошо изученного штамма *B. subtilis* 168, а также гомологичные ему гены из выделенных на территориях России и Беларуси штаммов *B. subtilis* 1,5 и 4K34. Нуклеотидные последовательности клонированного гена из штаммов 1,5 и 4K34 оказались длиннее рамки считывания из штамма 168 на три нуклеотида за счет инсерции кодирующего аланин триплета непосредственно за старт-кодоном. Кроме того, в сравнении с последовательностью гена *thiO* из штамма 168 по всей длине генов из штаммов 1,5 и 4K34 располагались 9 и 14 нуклеотидных замены соответственно. Эти нуклеотидные замены привели к трем и шести отличиям кодируемых генами из штаммов 1,5 и 4K34 аминокислотных последовательностей от последовательности глициноксидазы из штамма 168. По крайней мере часть этих аминокислотных замен была неконсервативной, в связи с чем можно было ожидать некоторых отличий свойств ферментов из трех штаммов. Более существенным на наш взгляд было присутствие дополнительного аланинового остатка у ферментов из штаммов 1,5 и 4K34 во втором положении с N-конца. У фермента из штамма 168 второй и третий аминокислотный остаток являются основными (Lys и Arg), что могло снизить стабильность белка при экспрессии в клетках растений. В связи с этим вся дальнейшая работа производилась только с генами из штаммов 1,5 и 4K34.

На следующем этапе работы глициноксидаза была изменена путем сайт-направленного мутагенеза так, что этот фермент стал более активным по отношению к глифосату, чем к глицину. Для осуществления мутагенеза гены глициноксидазы из плазмид pGO1 и pGO2 были переклонированы в полилинкерную область специализированного вектора для мутагенеза – pAlter-1. Полученные плазмиды были обозначены pGO10 и pGO20 соответственно. В данных конструкциях ген *thiO* помещен под контроль *lac*-промотора (а эффективный рибосомсвязывающий сайт введен в составе праймера GO<sub>r</sub>), что позволяет гену хорошо экспрессироваться в клетках *E. coli*. Для оценки функциональности данного фермента был применен чашечный тест [11].



Колонии *E. coli* JM109 с плазмидами pAlter-1 (1), pGO10 (2) и pGO20 (3) выращивали 24 ч на селективной среде с саркозином при 34°C, а затем выдерживали 3 суток при температуре 4°C

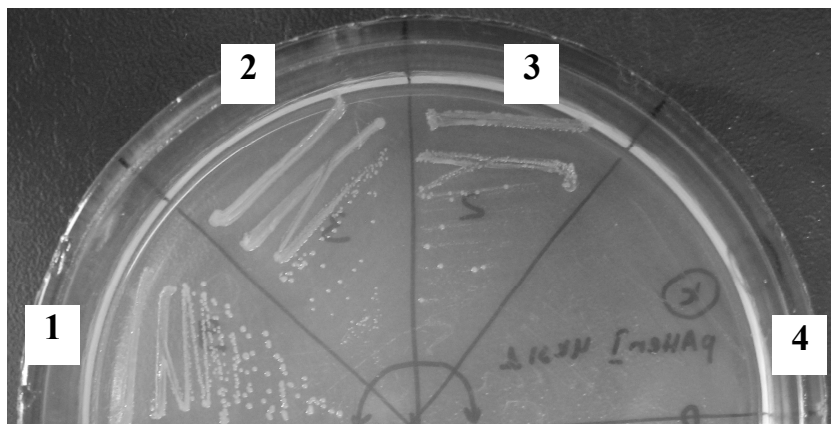
Рисунок 1 – Тест на глициноксидазную активность

В результате такого теста было показано, гены GO из штаммов *B. subtilis* 1,5 и *B. subtilis* 4K34 функциональны, и их можно использовать для проведения мутагенеза. Мутагенез проводили с помощью системы «Altered Sites II» (Promega), для чего были разработаны соответствующие мутагенные праймеры (таблица 1). Использование мутагенного олигонуклеотида GO5154 позволяет осуществить замену четырех нуклеотидов, что на уровне белка приведет к замене Gly<sup>51</sup> на Ser и Ala<sup>54</sup> на Arg. Второй праймер предназначен для изменения целого кодона, что на уровне белка приведет к замене His<sup>244</sup> на Ala.

Замена Gly<sup>51</sup> на Ser и Ala<sup>54</sup> на Arg приводит к изменению активного центра GO, в результате чего фермент связывается с глифосатом в оптимальном положении для катализа. Замена His<sup>244</sup> на Ala имеет двойной эффект: приводит к увеличению сродства субстрата с ферментом и к двукратному увеличению экспрессии фермента [3].

Мутагенез был проведен в два этапа. На каждом этапе присутствие желаемых мутаций подтверждали секвенированием мутантного гена *thiO*. Сначала в ген *thiO* вводили 2 мутации, приводящие к заменам Gly<sup>51</sup>→Ser и Ala<sup>54</sup>→Arg. Конечным результатом данного этапа стали штаммы *E.coli* JM109, несущие мутантную глициноксидазу в составе вектора pAlter-1. Плазмиды с измененными таким образом генами *thiO* из штаммов 1,5 и 4K34 были обозначены pGO11 и pGO21 соответственно. Следует отметить, что на данном этапе селекцию мутантов проводили по способности *E.coli* JM109 с pGO11 и pGO21 расти на минимальных средах с 10 мМ глифосата.

В результате второго этапа мутагенеза с мутагенным олигонуклеотидом GO244 были получены мутантные варианты гена *thiO* *B. subtilis* из штаммов 1,5 и 4K34, несущие по три мутации (Gly<sup>51</sup>→Ser, Ala<sup>54</sup>→Arg и His<sup>244</sup>→Ala). Соответствующие плазмиды были обозначены pGO12 и pGO22. В чашечных тестах показано, что бактерии *E.coli* JM109, несущие плазмиду pGO10 или pGO20 с нативным геном *thiO*, неспособны расти на минимальных средах с глифосатом в концентрации выше 2 мМ, в то время как бактерии *E.coli* JM109 с плазмидой pGO12 или pGO22, обеспечивающие синтез мутантной глициноксидазы с тремя аминокислотными заменами, могут расти на средах с 20 мМ глифосата (рисунок 2). Кроме того, в чашечных тестах на глициноксидазную активность показано, что у мутантных вариантов фермента она существенно снижается, т.е. в конечном итоге у мутантных ферментов на фоне увеличения активности по отношению к глифосату произошло снижение таковой по отношению к глицину.



По секторам 1, 2, 3 – колонии, *E. coli* JM109 с плазмидой pGO22, 4 – контроль: отсутствие роста бактерий *E. coli* JM109, несущих плазмиду pGO20

Рисунок 2 – Чашечный тест на устойчивость к глифосату (20 мМ)

Таким образом, в ходе настоящей работы клонированы гены, кодирующие фермент глициноксидазу, из трех штаммов бактерий *B. subtilis*. После введения в GO из штаммов 1,5 и 4K34 гены трех мутаций у фермента изменилась субстратная специфичность: увеличилась глифосатоксидазная активность и уменьшилась глициноксидазная. В дальнейшем планируется конструирование трансгенных растений, экспрессирующих полученные в настоящей работе мутантные версии глициноксидазы и проверка их устойчивости к глифосату.

**Список литературы**

- 1 Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene / L.A. Castle [et al.] // Science. – 2004. – Vol 304. – P. 1151–1154.
2. Expression of a bacterial *aroA* mutant, *aroA*-M1, encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase for the production of glyphosate-resistant tobacco plants / H.-Y. Wang [et al.] // J Plant Res. – 2003. – Vol 116. – P. 455–460.
3. Glyphosate resistance by engineering the flavoenzyme glycine oxidase / M. Pedotti [et al.] // The Journal Of Biological Chemistry. – 2009. – Vol. 284, № 52. – P. 36415–36423.
4. Gougler, J.A. Uptake and distribution of N-phosphonomethylglycine in sugar beet plants / J.A. Gougler, D.R. Geiger // Plant Physiol. – 1981. – Vol 68, № 3. – P. 668–672.
5. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and nonglyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) / W.A. Pline [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2002. – Vol 50, № 3. – P. 506–512.
6. Glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. Characterization of a new flavoprotein / V. Job [et al.] // J. Biol.Chem. – 2002. – Vol 277. – P. 6985–6993.
7. Overexpression of a recombinant wild-type and His-tagged *Bacillus subtilis* glycine oxidase in *Escherichia coli* / V. Job [et al.] // Eur. J. Biochem. 2002. – Vol 269. – P. 1456–1463.
8. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук // 1984, М.: Мир. – 480 с.
9. Bron, S. Molecular biological methods for *Bacillus*. / S. Bron // 1990, London: John Wiley & Sons Ltd, P. 75–174.
10. Dower, W.J. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation / W.J. Dower, J.F. Miller, C.W. Ragsdale // Nucleic Acids Res. – 1988. – Vol 16. – P. 6127–6145.
11. Preparation and properties of recombinant corynebacterial sarcosine oxidase: evidence for posttranslational modification during turnover with sarcosine / L. Chlumsky [et al.] // Biochemistry. – 1993. – Vol 32. – P. 11132–11142.

**MOLECULAR CLONING AND SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF THE GLYCINE OXIDASE GENE FROM *BACILLUS SUBTILIS***

**Yu.V. Seliashniva, Y.A. Nikolaichik, A.P. Baranets, A.N. Evtushenkov**

*Belarusian State University, Minsk, Belarus*

We have cloned the glycine oxidase gene (*thiO*) from three *B. subtilis* strains. Several replacements in nucleotide sequence were made in order to change three amino acid residues in glycine oxidase and alter its substrate specificity. The mutant glycine oxidase variants were able to actively oxidise glyphosate and allowed *Escherichia coli* cells to grow on plates with high concentrations of this herbicide.